

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-124652

(43)Date of publication of application : 13.05.1997

(51)Int.Cl.

C07D487/22  
A61K 31/40  
A61K 49/00  
G01N 33/50  
// A61N 5/06

(21)Application number : 07-315710

(22)Date of filing : 30.10.1995

(71)Applicant : TOYO HATSUKA KOGYO KK

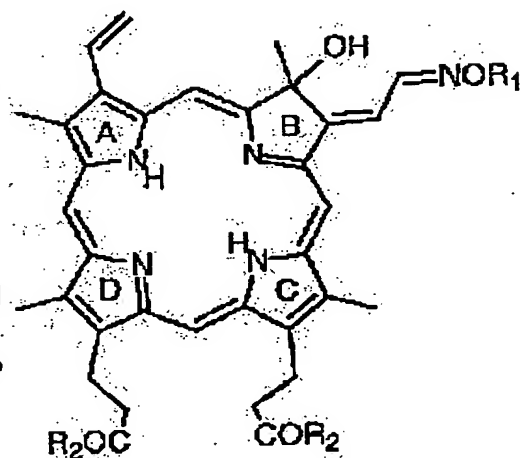
(72)Inventor : SAKATA ISAO  
NAKAJIMA SUSUMU  
KOSHIMIZU KOICHI  
TAKADA HIROYUKI  
INUI YASUSHI

## (54) PORPHYRIN DERIVATIVE AND USE THEREOF

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the above compound having accumulation property to cancer cell, reactivity to external energy and destructing action on cancer cell, free from toxicity to normal cells and useful as an agent for the treatment or the diagnosis of cancer.

SOLUTION: This porphyrin compound is expressed by the formula [R1 is CH3, C2H5, CH2CH(CH3)2, CH2C6H5 or CH2C6F5; R2 is a residue produced by removing H from aspartic acid] (including position isomers obtained by exchanging the functional groups of the side chains on the rings A and B among four tetrapyrrole rings in the formula), e.g. 13, 17-bispropionylaspartic acid-3-ethenyl-7-hydroxy-8-methoxyiminoethylidene-2,7,12,18-tetramethyl-porphyrin. The compound of the formula can be produced, e.g. by producing a chlorin derivative having corresponding aldehyde group, bonding an aspartic acid residue to the derivative and condensing the product to a hydroxylamine derivative.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.09.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3718887

[Date of registration]

16.09.2005

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

[JP,09-124652,A]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated. \* NOTICES \*

---

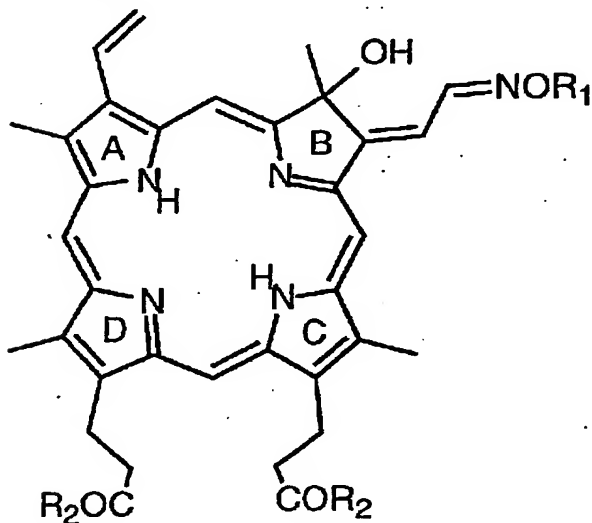
## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] General formula (I) Porphyrin compound shown by-izing 1 (inside of a formula, residue excluding [ CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, and R<sub>2</sub> ] hydrogen from the aspartic acid in R<sub>1</sub>). (However, the functional group of the side chain of B ring also contains among a formula the position isomer which interchanged, respectively among [ A ] four tetrapyrrole rings.)

[Formula 1]



[Claim 2] The object for an optical physicochemical diagnosis and/or the sensitizer for a therapy which consist of a porphyrin compound according to claim 1.

[Claim 3] The sensitizer for optical physical chemistry according to claim 2 used for a diagnosis and/or therapy of cancer.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the drugs which use a porphyrin derivative, and the application and an especially new porphyrin derivative for the diagnosis and therapy of cancer by the sensitizer and/or the optical physical chemistry for the object for an optical physicochemical diagnosis, and a therapy which are made into an active principle.

[0002]

[Description of the Prior Art] The optical physicochemical diagnostic therapy (PDT) is performed as a new cure for cancer. After this prescribing a porphyrin compound of a certain kind for the patient by approaches, such as an intravenous injection, and making it hold it in a cancer organization, it irradiates laser light and it destroys only a cancer organization alternatively. PDT uses two properties in which the time amount held in the cancer organization of a porphyrin has the property in which it is long compared with normal tissue, and a photosensitization operation. In the past 15 years, 5000 or more people are treated for the malignant tumor by PDT all over the world, and it was established as one of the cancer treatments. Retina cancer, skin carcinoma, an esophagus cancer, superficialness vesical cancer, early lung cancer, etc. are going across the cancer type it is reported by PDT that good treatment results are variably.

[0003] The drugs currently used for current PDT are mainly a hematoporphyrin derivative (HPD) and photofrin. II\*\*R They are (the ether object of HPD, and/or the dimer of an ester object). HPD is mixture which carries out vitriolization in an acetic acid of the hematoporphyrin, and is processed and obtained by 0.1 moreN sodium hydroxide. Moreover, photofrin II\*\*R Although it ages \*\* 1995 and clinical application is carried out in Japan, the hydrophobic high component of HPD is mainly included, with HPD, it is complicated mixture and an active ingredient is unknown. Moreover, since the component ratio is not fixed, a curative effect is very unstable.

[0004] On the other hand, the new porphyrin derivative for PDT is indicated by [Br.J.Cancer, 55,483 (1987)] by JP,1-246286,A, No. 145283 [ Showa 63 to ], No. 205082 [ Showa 62 to ], No. 167783 [ Showa 62 to ], JP,62-249986,A, No. 246580 [ Showa 62 to ], No. 246579 [ Showa 62 to ], No. 205081 [ Showa 62 to ], and

J.F.Evensen and others. Moreover, a porphyrin dimer derivative is indicated by a U.S. Pat. No. 4649151 number (1987), JP,62-63586,A, and No. 500132 [ Showa 60 to, and the porphyrin metal complex is indicated for the chlorin derivative by JP,1-250381,A, No. 290881 / Showa 63 to, No. 5986 / Showa 62 to, No. 5985 / Showa 62 to, No. 5924 / Showa 62 to, No. 5912 / Showa 62 to, No. 981 / Showa 58 to /, and No. 185220 / Showa 57 to / at JP,1-221382,A, No. 104987 / Showa 63 to, and No. 31688 / Showa 57 to /. META tetra-hydroxyphenyl which very recently has absorption near 670nm Porphyrin derivatives, such as a chlorin (m-THPC) and a benzoporphyrin derivative (BPD), have also been developed. Many things were examined, the porphyrin metal complex has been indicated to JP,2-138280,A, No. 174079 [ Showa 62 to ], JP,4-24661,B, Taira No. 15545 [ six to ], and Taira No. 25763 [ seven to ], and we have also indicated the bacteriochlorin derivative for the chlorin derivative to JP,63-196586,A at JP,61-7279,A and No. 92287 [ Showa 60 to ]. However, utilization was [ in / with the above-mentioned compound / composition, stability, and a water-soluble field ] difficult for using as a sensitizer for PDT. Then, although it inquired further, the alkoxy porphyrin amino acid derivative and the chlorin derivative were indicated to JP,5-97857,A and the effectiveness as a sensitizer for PDT was shown, the derivative with which a still higher curative effect is acquired is expected. [0005] Moreover, there is also a problem of organization permeability of the laser light used for PDT. HPD and photofrin II\*\*R \*\*\*\*\* absorption wavelength is 630nm and a molar extinction coefficient is also as low as 3000. With 630nm light, organization permeability will be bad and will be limited to the surface cancer whose curative effect of PDT is 5-10mm.

[0006] On the other hand, there is a problem also in laser equipment. The dye laser present most often used has bad stability, and the handling on employment is difficult for it. Employment will become quite easy if titanium sapphire laser is used. However, HPD and Ptofrin which will be restricted to 670nm or more absorption wavelength of 600nm or less if this laser is used, and have the absorption wavelength near 630nm II\*\*R being alike — it is inapplicable. Recently, the compound which semiconductor laser (670nm) is also developed and has absorption in 670nm has been made advantageous.

[0007] Furthermore, causing photosensitivity temporary as a side effect of drugs is known. For this reason, after medication, a patient must be confined in a dark place for a long period of time so that normal tissues, such as the skin, may not be destroyed in a photosensitization operation. HPD and Ptofrin II\*\*R Since the elimination rate from \*\*\*\*\* is slow, when long, photosensitivity may remain six weeks or more. The

drugs by which current use is carried out are holding the trouble of such many, and are HPD and Photofrin. II\*\*R Development of the new drugs which are alike and replace is desired strongly. Then, the compound which is a single compound as what conquers the fault which the above-mentioned drugs have, and has absorption in a long wavelength field (650-800nm) more is proposed as a drug of the second generation. Various compounds, such as ring escape mold porphyrins, such as porphyrins, such as aza-porphyrins, such as a current phthalocyanine, and chlorin bacteriochlorin, and TEKISAFIRIN, are studied.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] With the good accumulation nature to stability and a cancer organization maintain, from normal tissue, the elimination rate reduced phototoxicity quickly, and when it could moreover do and having been got, it looked for the Bolu Phi Lynne derivative which can use titanium sapphire laser ( 670nm or more wavelength of 600nm or less), and semiconductor laser ( 670nm), and this invention persons be single components and repeated various researches for the purpose of offer the photosensitizer suitable for PDT.

[0009]

[Means for Solving the Problem] Consequently, it found out have the longest wavelength absorption end 670 morenm or more for eccritic [ more prompt than the accumulation nature and normal tissue which be excellent in the single component to the cancer organization ] in the side chain of the chlorins which carried out synthetic derivatization in the derivative ( JP,5-97857,A) of application more nearly before than the protoporphyrin of the blood origin, when a certain kind of an imino group and aspartic acid residue be combine, and have the good PDT effectiveness.

[0010] Moreover, when, as for this invention persons, these chlorin derivative and the ultraviolet absorption (UV) spectrum of the mixture of albumin as well as the derivative (JP,5-97857,A) of application were analyzed before, it turned out that the trend of a spectrum has led to the compatibility to a positive direction, i.e., a specific organ, especially cancer.

[0011] On the other hand, this invention persons are [0012] having a strong operation turned out to be when the photosensitized oxidation using the system of a dansyl methionine substrate which can evaluate the reactant strength to light by thin-layer chromatography (TLC) or high performance chromatography (HPLC) simple before like the derivative (Japanese Patent Application No. No. 276488 [ four to ]) of application estimated these chlorin derivative. This invention is completed based on the above-mentioned knowledge, and the summary is the general formula -ization 1

(among a formula). (I) The porphyrin compound shown by the residue excluding [ CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, and R<sub>2</sub> ] hydrogen from the aspartic acid in R<sub>1</sub> It expresses also (including [ however, ] the position isomer) with which the functional group of the side chain of B ring interchanged among [ A ] four tetrapyrrole rings among the formula, respectively.

[0013] The porphyrin compound of this invention can be manufactured by the very thing conventionality. If it is in the porphyrin compound corresponding to a general formula (I), it derivatizes to the compound which has an aldehyde group first (process a), and the residue of an aspartic acid is made to combine (process b), and condensation of the various hydroxylamine derivatives is carried out to the obtained chlorin derivative (process c). Moreover, a process (b) and (c) may not carry out a sequential reaction, and as shown in (c) and (b), the order of a process may not necessarily replace them.

[0014] A configuration process (a) can perform this by the conventional approach indicated by J.E.Falk work [Porphyrins and Metalloporphyrins] (Elsevier issue, 1975), D.Dolphin work [The Porphyrins] (AcademicPress issue, 1978), etc.

[0015] For example, what is the porphyrin compound which has R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> corresponding to (I) should just prepare this according to the approach indicated by JP,61-7279,A, JP,63-13997,B, JP,6-15545,B, JP,7-25763,B, JP,2-138280,A, JP,4-59779,A, JP,5-97857,A, and Japanese Patent Application No. No. 323597 [ three to ]. That is, about (a), it is protoporphyrin a chlorin chemically-modified degree. The 1-hydroxy-2-formyl ethylidene-protoporphyrin dimethyl ester (henceforth P-Me) obtained by carrying out photochemical reaction processing of the dimethyl ester (henceforth PP-Me) is prepared (however, 3 which the functional group of the side chain of B ring replaced among [ A ] four tetrapyrrole rings, respectively - [ A hydroxy-4-formyl ethylidene-protoporphyrin dimethyl ester object is also included. ]).

[0016] Next, the joint process (b) of the residue of amino acid is given. That is, an aspartic acid is made to react to the porphyrin compound (I) whose R<sub>2</sub> is a hydroxyl group, and R<sub>2</sub> manufactures an aspartic-acid support porphyrin compound (I). By the conventional approach indicated by the Izumi store work [the foundation of peptide synthesis, and an experiment] (the Maruzen issue, 1985) etc., this thing can perform this and should just prepare this according to the approach indicated by JP,64-61481,A, JP,7-25763,B, JP,2-138280,A, and JP,4-59779,A.

[0017] In this case, since what is necessary is just to introduce the residue of an aspartic acid into the side chain of a porphyrin compound in short, it is desirable to advance a reaction between the carboxyl group of R<sub>2</sub> side chain of (I) and the amino

group of an aspartic acid, for this reason, the former carboxyl group and/or the latter amino group may be changed into a conventional reactant radical, or protecting suitably the functional group it is not desirable to participate in the reaction to which it exists in both may be taken into consideration. In addition, in any case, use of a reaction accelerator like a dehydrating agent or a deoxidizer or a condensing agent may also be suitably taken into consideration.

[0018] The chlorin compound constituted as mentioned above is given to a condensation process (c). A hydroxylamine derivative is made to react to P-Me, and a condensation product porphyrin compound is manufactured. This thing can perform this by the conventional approach indicated by the general organic chemistry experiment in the letter [the condensation reaction of a hydroxylamine and an aldehyde compound]. In addition, instead of compounding artificially, this may be extracted from a natural resource like vegetation or an animal.

[0019] Hereafter, the example of representation is given and preparation of a porphyrin compound (I) is explained still more concretely. For example, the 1-hydroxy-2-formyl ethylidene-protoporphyrin (it is called Following P) obtained by hydrolyzing P-Me is prepared (however, the functional group of the side chain of B ring also contains the 3-hydroxy-4-formyl ethylidene-protoporphyrin which interchanged, respectively among [ A ] four tetrapyrrole rings.). To this, it is an aspartic acid. Methyl ester etc. is made to react using a condensing agent (for example, [dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and water-soluble cull POJIIMIDO (WSC)]) etc. in a solvent, and the porphyrin compound (I) which aspartic-acid residue combined with the side chain of R2 is obtained. Subsequently, hydroxylamine derivatives (for example, O-methyl hydroxylamine, O-ethyl hydroxylamine, O-benzyl hydroxylamine, etc.) are made to react using condensing agents (for example, a pyridine, a piperidine, an acid, alkali, etc.) in a solvent, and the porphyrin compound (I) which these compounds condensed in the side chain of R1 is obtained. The following can be mentioned as the example.

[0020] (1) 13 17-screw propionyl aspartic-acid-3-ethenyl-7-hydroxy-8-methoxy imino ethylidene - 2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphin (henceforth NOME-P-diAsp)

(2) 13 17-screw propionyl aspartic-acid-3-ethenyl-7-hydroxy-8-ethoxy imino ethylidene - 2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphin (henceforth NOEt-P-diAsp)

(3) 13, 17-bis-propionyl aspartic acid -3 - Ethenyl-7-hydroxy-8-iso butoxy imino ethylidene - 2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphin (henceforth NOisoBu-P-diAsp)

(4) 13 17-screw propionyl aspartic-acid-3-ethenyl-7-hydroxy-8-benzyloxy imino ethylidene - 2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphin (henceforth NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-diAsp)



(5) 13, 17-bis-propionyl aspartic acid -3 - Ethenyl-7-hydroxy-8-pentafluoro benzyloxy imino ethylidene - 2, 7, 12, 18-tetramethyl-porphin (henceforth NOCH2C6F5-P-diAsp)

[0021] What is necessary is just to perform manufacture of the drugs pharmaceutical preparation of the porphyrin derivative by this invention by the the very thing well-known method, and to dissolve the derivative by this invention with the suitable buffer solution. The solubilizing agent (for example, organic solvent) which uses as a suitable additive, for example, can be admitted in physic, pH modifier (for example, an acid, a base, the buffer solution), a stabilizer (for example, ascorbic acid), an excipient (for example, glucose), an isotonicizing agent (for example, sodium chloride), etc. may be blended.

[0022] the drugs by this invention — the need as drugs for PDT — the compatibility over albumin, sufficient property, i.e., long phosphorescence life, a specific organ especially the specific accumulation nature to cancer, the optical killer cell effectiveness by dansyl methionine evaluation, absorption wavelength, water solubility, purity, etc. are satisfied enough. The good water solubility of the drugs by this invention enables manufacture of a high concentration solution (50mg/(ml)), and the drugs by this invention show high stability further not only in the inside of a test tube but in the living body. Generally, in order to apply as drugs for PDT, it is desirable to prescribe the drugs of this invention for the patient in the amount of 1mg - 5 mg/kg weight.

[0023]

[Function] The porphyrin compound concerning this invention has the description on the chemical structure at the point of having amino acid residue or an aldehyde condensation product in the side chain of a porphyrin frame, and, as a result, demonstrates various physiological or pharmacological profiles.

[0024] A cancer cell is piled up alternatively and these porphyrins derivative has the slow elimination from a cancer cell. In addition, from a normal organ or a cell, since it is excreted promptly, damage is not done to them. Originally, although the thing of \*\*\*\*\* of a porphyrin derivative had the strong operation to light, while it raised excretory [ from normal tissue ] by introducing polyfunctional compound residue into the side chain of a porphyrin derivative according to this invention, the derivative of it designed so that a phototoxic manifestation might be controlled as much as possible became possible. Moreover, when chlorin derivatization of the porphyrin was carried out and wavelength carried out a red shift, the degrees of \*\* of a curative effect were able to be measured. The porphyrin derivative of this invention is useful as PDT drugs

[ as opposed to an organ especially specific cancer, or a specific malignant tumor based on these properties (cancer compatibility, the optical killer cell effectiveness, absorption wavelength, water solubility) ].

[0025] An example is given and explained below. In addition, all the yield in an example is the values converted and calculated from PP-Me which is a start raw material.

[0026]

[Example]

example synthetic R.K of 1P — it compounded according to Dinello's and others approach [The Porphyrins, Academic Press issue, and Vol.1,303 (1978)]. PP-Me100g was dissolved in chloroform 10L, and it was made to react for one week under an optical exposure. (From a porphyrin to chlorin derivatization) After [ a reaction ] vacuum concentration was carried out and residue was obtained. The obtained residue was refined in silica gel column chromatography — (eluate: n-hexane-chloroform), and P-Me was obtained. (50.0g) Then, this was hydrolyzed in pyridine methanol mixture and P of a dark green crystal was obtained. (43.0g, 42.7% of yield)

[0027] Example P2g obtained in the aspartic-acid derivatization example 1 of two porphyrins was dissolved in the tetrahydrofuran, and it considered as the P-DCHA salt (2.0g) with the conventional method in dicyclohexylamine (DCHA). This DCHA salt is dissolved in chloroform 150ml, and it is an aspartic acid. 2g of dimethyl ester (AspMe) hydrochlorides was added, and you added water-soluble carbodiimide (WSC) 2g gradually to the bottom of churning, and made it react for 1.5 hours. Vacuum concentration of the chloroform layer was carried out for reaction mixture after rinsing liquid separation after the reaction (a reaction end point is checked in TLC). Reprecipitation and recrystallization were repeated in the ethyl-acetate-ether-n-hexane, the obtained concentrate was performed, and photograph pro TOPORUFINIRU -6 of a dark green crystal and 7-bis-aspartic-acid tetramethyl ester (henceforth P-AspMe) were obtained. (1.2g, 17.3% of yield)

[0028] example P-AspMe500mg obtained in the synthetic example 2 of 3 NOME-P-diAsp (1) — pyridine 20ml — dissolving — the bottom of room temperature churning — 150mg of O-methyl hydroxylamine hydrochlorides — addition — you made it react for 30 minutes Chloroform was added to reaction mixture after the reaction, and vacuum concentration of the chloroform layer after rinsing liquid separation was carried out. The obtained concentrate was reprecipitated in the ethyl-acetate-n-hexane, precipitate was dissolved in pyridine 10ml after separation desiccation, and it hydrolyzed by adding 10ml of 1-N sodium hydroxides. Liquids were

separated under chloroform after neutralization with 1-N hydrochloric acid, and vacuum concentration of the chloroform layer was carried out. The concentrate was reprecipitated in the methanol-ethyl-acetate-n-hexane and NOME-P-diAsp (1) of a dark green crystal was obtained. (390mg, 13.9%)

[0029] example P-AspMe500mg obtained in the synthetic example 2 of 4 NOEt-P-diAsp (2) -- pyridine 20ml -- dissolving -- the bottom of room temperature churning -- 150mg of O-ethyl hydroxylamine hydrochlorides -- addition -- you made it react for 30 minutes Chloroform was added to reaction mixture after the reaction, and vacuum concentration of the chloroform layer after rinsing liquid separation was carried out. The obtained concentrate was reprecipitated in the ethyl-acetate-n-hexane, precipitate was dissolved in pyridine 10ml after separation desiccation, and it hydrolyzed by adding 10ml of 1-N sodium hydroxides. Liquids were separated under chloroform after neutralization with 1-N hydrochloric acid, and vacuum concentration of the chloroform layer was carried out. The concentrate was reprecipitated in the methanol-ethyl-acetate-n-hexane and NOEt-P-diAsp (2) of a dark green crystal was obtained. (420mg, 14.8%)

[0030] example P-AspMe500mg obtained in the synthetic example 2 of 5 NOisoBu-P-diAsp (3) -- pyridine 20ml -- dissolving -- the bottom of room temperature churning -- 150mg of O-isobutyl hydroxylamine hydrochlorides -- addition -- you made it react for 30 minutes Chloroform was added to reaction mixture after the reaction, and vacuum concentration of the chloroform layer after rinsing liquid separation was carried out. The obtained concentrate was reprecipitated in the ethyl-acetate-n-hexane, precipitate was dissolved in pyridine 10ml after separation desiccation, and it hydrolyzed by adding 10ml of 1-N sodium hydroxides. Liquids were separated under chloroform after neutralization with 1-N hydrochloric acid, and vacuum concentration of the chloroform layer was carried out. The concentrate was reprecipitated in the methanol-ethyl-acetate-n-hexane and NOisoBu-P-diAsp (3) of a dark green crystal was obtained. (450mg, 15.3%)

[0031] example P-AspMe500mg obtained in the synthetic example 2 of 6NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-diAsp (4) -- pyridine 20ml -- dissolving -- the bottom of room temperature churning -- 150mg of O-benzyl hydroxylamine hydrochlorides -- addition -- you made it react for 60 minutes Chloroform was added to reaction mixture after the reaction, and vacuum concentration of the chloroform layer after rinsing liquid separation was carried out. The obtained concentrate was reprecipitated in the ethyl-acetate-n-hexane, precipitate was dissolved in pyridine 10ml after separation desiccation, and it hydrolyzed by adding 10ml of 1-N sodium hydroxides.

Liquids were separated under chloroform after neutralization with 1-N hydrochloric acid, and vacuum concentration of the chloroform layer was carried out. The concentrate was reprecipitated in the methanol-ethyl-acetate-n-hexane and NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-diAsp (4) of a dark green crystal was obtained. (400mg, 13.1%)

[0032] example P-AspMe500mg obtained in the synthetic example 2 of 7NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-diAsp (5) — pyridine 20ml — dissolving — the bottom of room temperature churning — 150mg of O-(pentafluoro benzyl) hydroxylamine hydrochlorides — addition — you made it react for 120 minutes Chloroform was added to reaction mixture after the reaction, and vacuum concentration of the chloroform layer after rinsing liquid separation was carried out. The obtained concentrate was reprecipitated in the ethyl-acetate-n-hexane, precipitate was dissolved in pyridine 10ml after separation desiccation, and it hydrolyzed by adding 10ml of 1-N sodium hydroxides. Liquids were separated under chloroform after neutralization with 1-N hydrochloric acid, and vacuum concentration of the chloroform layer was carried out. The concentrate was reprecipitated in the methanol-ethyl-acetate-n-hexane and NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-diAsp (5) of a dark green crystal was obtained. (390mg, 11.7%)

[0033] Example Laser radiation in 8 extraction organs (excitation fluorescence spectrum)

5mg test drug NOME-P-diAsp (1) diluted with the phosphate buffer solution (1ml) to the golden hamster (one groups [ five ]) on 14 – the 21st which transplanted the pancreatic cancer cell of nitrosamine oncogenesis After intravenous injection, It is N2-pulsed to each organ which extracted each organ including cancer and was obtained. The exposure and the excitation fluorescence spectrum were measured for laser (N2,337nm, 2ns, 400–1000nm), and the wavelength of 600–900nm was examined on the basis of the peak wavelength of 470nm NADH. (N2-PLS measurement) The result (cancer / each organ ratio) obtained like the following is shown in Table 1. Table 1 measures each excitation fluorescence spectrum of each organ extracted 3 hours after medication, and shows the value which computed the peak wavelength in 600–900nm by making peak wavelength of 470nm into criteria 1.

[0034]

[Table 1]

化 合 物 名	癌/臓器			
	癌/肝	癌/肺	癌/腎	癌/血清
(1) N O M e - P - d i A s p	0.16	0.91	0.25	1.07
(2) N O E t - P - d i A s p	1.16	-	6.70	0.32
(4) N O C H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - P - d i A s p	1.84	17.0	34.0	5.40
(5) N O C H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> - P - d i A s p	2.80	14.0	2.80	0.07

[0035] Example 10micro (dansyl methionine) of evaluation substrates M of photosensitized oxidation using 9 dansyl methionine is dissolved in chloroform 1ml, 0.1micro of sensitizers M obtained in said example is added, and it is Cold under stirring. Spot It irradiated by PICL-SX (Nippon P.I.Co..Ltd.) (a halogen lamp, 150W, 80,000Lux). The spot of the reaction mixture was carried out to the TLC plate (Kieselgel 60 F254) for every optical exposure part, the expansion back was checked with the chloroform-methanol (3:2) and a dansyl methionine and its oxidation product (dansyl methionine sulfoxide) were checked with UV lamp (254nm). Time amount to which the dansyl methionine disappeared completely was made into reaction end time on the TLC plate, and comparison examination of the strength of the photooxidation reaction of each sensitizer was carried out. The result is shown in drawing 1 and Table 2. In addition, the axis of ordinate in drawing 1 shows Rf, an axis of abscissa shows time amount (minute), Rf value 0.79 is a dansyl methionine and 0.43 is a dansyl methionine. It is the spot of a sulfoxide. Moreover, the numeric value of Table 2 shows the completion time amount of a reaction by the part, and means that a photooxidation reaction is stronger as this value (minute) is small.

[0036]

[Table 2]

化 合 物 名	光反応の強さ
Photofrin®	10<
(1) NOME-P-diAsp	4
(2) NOEt-P-diAsp	4
(3) NOisoBu-P-diAsp	4
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-diAsp	4
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-diAsp	4

[0037] Example 10 ultraviolet-absorption analysis of a spectrum (albumin test)

It is known that a porphyrin compound will form two monomers or a polymer in an albumin solution. This property can be understood by migration of an absorption maximum value or fluctuation of an absorbancy index being seen by analyzing by changing various albumin concentration. Therefore, it is an easy screening test for examining compatibility with a cancer cell. Albumin 54mg is dissolved in a 3ml physiological saline, and it considers as concentration 1.8%. Subsequently, the liquid which diluted this 10 times and was made into 0.18% was diluted with the common ratio 3, and the liquid of each albumin concentration (1.8, 0.18, 0.06, 0.02, 0.0066, 0.0022%) was prepared. On the other hand, 1mg of porphyrin derivatives was dissolved in 1ml (pH8.0) of phosphate buffer solutions, and it was made 100ml with the physiological saline. And 2ml of albumin diluents and 2ml of porphyrin solutions were mixed, the albumin last concentration of mixture was made into 0.9, 0.09, 0.03, 0.01, 0.0033, and 0.0011%, and ultraviolet absorption spectrum measurement (350-900nm) was performed. Moreover, it measured similarly in the physiological saline and the methanol solution instead of the albumin diluent. These measurement results are shown in Table 3. As the example of representation, the ultraviolet absorption spectrum of NOME-P-diAsp (1) is shown in drawing 2 and drawing 3.

[0038]

[Table 3]

化 合 物 名	波 長 (nm)		
	生 理 食塩水	メタノー ル	0.9 %ア ルブミン
(1) N O M e - P - d i A s p	6 6 5	6 6 7	6 7 0
(2) N O E t - P - d i A s p	6 6 5	6 6 7	6 7 0
(3) N O i s o B u - P - d i A s p	6 6 5	6 6 7	6 7 0
(4) N O C H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - P - d i A s p	6 6 6	6 6 7	6 7 0
(5) N O C H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> - P - d i A s p	6 6 6	6 6 6	6 7 0

[0039] Example The infrared absorption spectrum of this derivative was measured with the KBr briquette method with 11 infrared-absorption-spectrum analysis infrared spectrophotometer. As the example of representation, the infrared absorption spectrum of NOEt-P-diAsp (2) is shown in drawing 4.

[0040]

[Effect of the Invention] Since the porphyrin derivative of this invention has the accumulation nature to a cancer cell, the reactivity over external energy, and a destructive operation of a cancer cell and moreover does not discover toxicity to a normal cell, it reaches [ as cancer treatment medicine or a cancer diagnostic drug ] to an extreme and is useful.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the thin-layer chromatogram using NOisoBu-P-diAsp(3) tetramethyl ester as a sensitizer.

[Drawing 2] It is drawing showing the ultraviolet absorption spectrum of N O M e - P - d i A s p (1).

[Drawing 3] It is drawing showing the ultraviolet absorption spectrum of N O M e - P - d i A s p (1).

[Drawing 4] It is drawing showing the infrared absorption spectrum of NOEt-P-diAsp

(2).

[Description of Notations]

1 Porphyrin Solution and Mixture of Physiological Saline (0% of Albumin Concentration)

2 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.0011% of Albumin Concentration)

3 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.0033% of Albumin Concentration)

4 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.01% of Albumin Concentration)

5 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.03% of Albumin Concentration)

6 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.09% of Albumin Concentration)

7 Mixture of Porphyrin Solution and Albumin Solution (0.9% of Albumin Concentration)

8 Porphyrin Solution and Mixture of Methanol



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-124652

(43) 公開日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 487/22			C 0 7 D 487/22	
A 6 1 K 31/40	ADU		A 6 1 K 31/40	ADU
		49/00		A
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	T
				Z
審査請求 未請求 請求項の数3 書面 (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-315710

(22) 出願日 平成7年(1995)10月30日

(71) 出願人 591273432

東洋蔦荷工業株式会社

岡山県浅口郡里庄町大字浜中75番地の1

(72) 発明者 阪田 功

岡山県笠岡市小平井1766番地の4

(72) 発明者 中島 進

北海道旭川市緑が丘5条4丁目4番地の34

(72) 発明者 小清水 弘一

奈良県奈良市法蓮山添西町856番地の10

(72) 発明者 高田 弘之

岡山県浅口郡里庄町里見2098番地

(72) 発明者 乾 裕史

広島県福山市春日町浦上779番地の7

(74) 代理人 弁護士 高橋 三郎

(54) 【発明の名称】 ポルフィリン誘導体とその用途

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、単一成分性、安定性、水溶性かつ特定の臓器特に癌への親和性に優れ、正常組織からの排出速度が速く光毒性を低減させることができ、しかもチタンサファイアレーザー（670nm以上600nm以下の波長）および半導体レーザー（670nm）の使用が可能であるポルフィリン誘導体を合成・探索し、光物理化学的診断治療（PDT）に適した光増感剤を提供することを目的とする。

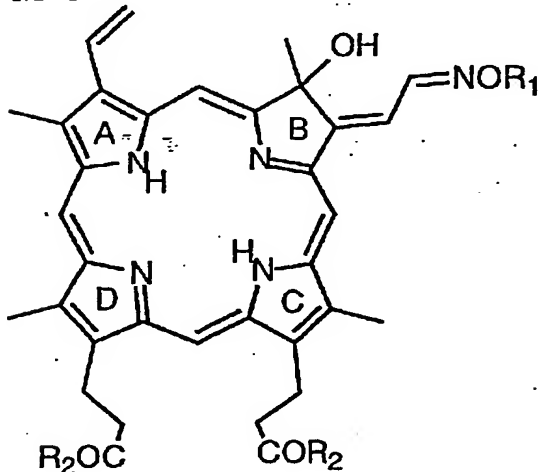
【構成】 本発明は、血液由来のプロトポルフィリンより合成誘導体化したアルデヒド基担持クロリン類に縮合させて得られたポルフィリン誘導体で構成される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式 (I) 化1

(式中、 $R_1$  は $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、 $CH_2CH(C_6H_5)_2$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $CH_2C_6F_5$ 、 $R_2$  はアスパラギン酸から水素を除いた残基) で示されるポルフィリン化合物。(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む。)

## 【化1】



【請求項2】 請求項1記載のポルフィリン化合物からなる光物理化学的診断用および/または治療用増感剤。

【請求項3】 癌の診断および/または治療に使用される請求項2記載の光物理化学用増感剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ポルフィリン誘導体とその用途、特に新規なポルフィリン誘導体を有効成分とする光物理化学的診断用および治療用の増感剤および/または光物理化学による癌の診断および治療に用いる薬剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】癌の新しい治療法として光物理化学的診断治療(PDT)が行われている。これはある種のポルフィリン化合物を静脈注射などの方法により投与し、癌組織に保持させた後、レーザー光を照射して癌組織のみを選択的に破壊するというものである。PDTは、ポルフィリンの癌組織に保持される時間が正常組織に比べて長いという性質と光増感作用を持つという2つの性質を利用している。過去15年間に世界中で5000人以上の人々がPDTによる悪性腫瘍の治療を受けており、癌治療法の1つとして定着しつつある。PDTにより良好な治療成績が報告されている癌種は、網膜癌、皮膚癌、食道癌、表在性膀胱癌、初期の肺癌等多岐に渡っている。

【0003】現在PDTに使用されている薬剤は主とし

てヘマトポルフィリン誘導体(HPD)およびphotofrin II $\blacktriangle R$  (HPDのエーテル体および/またはエステル体の二量体)である。HPDはヘマトポルフィリンを酢酸中硫酸処理し、さらに0.1N水酸化ナトリウムで処理して得られる混合物である。また、photofrin II $\blacktriangle R$ は1995年より日本で臨床応用されているが、HPDの疎水性の高い成分を主として含んでおり、HPDとともに複雑な混合物であり活性成分が不明である。また成分比が一定でないために治療効果が極めて不安定である。

【0004】一方、PDTのための新しいポルフィリン誘導体の特開平1-246286号、昭63-145283号、昭62-205082号、昭62-167783号、特開昭62-249986号、昭62-246580号、昭62-246579号および昭62-205081号に、そしてJ. F. Evensenらにより

[Br. J. Cancer, 55, 483 (1987)]に開示されている。また、クロリン誘導体の特開平1-250381号、昭63-290881号、昭62-5986号、昭62-5985号、昭62-5924号、昭62-5912号、昭58-981号および昭57-185220号に、ポルフィリンダイマー誘導体が米国特許4649151号(1987)、特開昭62-63586号および昭60-500132号に、ポルフィリン金属錯体の特開平1-221382号、昭63-104987号および昭57-31688号に開示されている。ごく最近になって、670nm付近に吸収を持つメタ-テトラヒドロキシフェニルクロリン(m-THPC)やベンゾポルフィリン誘導体(BPD)などのポルフィリン誘導体も開発されてきた。我々も種々検討し、クロリン誘導体の特開昭61-7279号および昭60-92287号に、ポルフィリン金属錯体の特開平2-138280号、昭62-174079号、特公平4-24661号、平6-15545号および平7-25763号に、バクテリオクロリン誘導体の特開昭63-196586号に開示してきた。しかしながら、PDT用の増感剤として用いるには上記化合物では合成、安定性、水溶性の面において実用化が困難であった。そこで更に検討を行い、アルコキシポルフィリンアミノ酸誘導体およびクロリン誘導体の特開平5-97857号に開示し、PDT用の増感剤としての有効性を示したが、さらに高い治療効果の得られる誘導体が期待されている。

【0005】またPDTに使われるレーザー光の組織透過性の問題もある。HPDやphotofrin II $\blacktriangle R$ は最大吸収波長が630nmであり、モル吸光係数も3000と低い。630nmの光では組織透過性が悪く、PDTの治療効果が5~10mmの表層癌に限定されてしまっている。

【0006】一方レーザー装置の方にも問題がある。現

在最もよく使用されている色素レーザーは安定性が悪く、運用上取扱いが難しい。チタンサファイアレーザーを用いれば運用がかなり簡単になる。しかしこのレーザーを用いると670nm以上600nm以下の吸収波長に限られ、630nm付近の吸収波長を持つHPDやPtofrin IIA $\blacktriangledown$ には適用できない。最近、半導体レーザー(670nm)も開発され670nmに吸収を持つ化合物が有利とされてきた。

【0007】更に薬剤の副作用として一時的な光過敏症を引き起こすことが知られている。このため薬剤投与後、皮膚などの正常組織が光増感作用で破壊されないように患者を長期間暗所に閉じ込めておかなければならない。HPDおよびPtofrin IIA $\blacktriangledown$ は正常組織からの排出速度が遅いので長いときには6週間以上も光過敏症が残ることもある。現在使用されている薬剤はこうした多くの問題点を抱えておりHPDおよびPhotofrin IIA $\blacktriangledown$ に代わる新しい薬剤の開発が強く望まれている。そこで上記薬剤が持つ欠点を克服するものとして単一化合物でありかつより長波長領域(650~800nm)に吸収を持つ化合物が第2世代の薬物として提案されている。現在フタロシアニンなどのアザポルフィリン類、クロリン・バクテリオクロリンなどのポルフィリン類、テキサフィリンなどの環拡張型ポルフィリン類などさまざまな化合物が研究されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、単一成分であり安定かつ癌組織に対する良好な集積性を維持したまま、正常組織からは排出速度が速く光毒性を低減させ、しかもできうればチタンサファイアレーザー(670nm以上600nm以下の波長)ならびに半導体レーザー(670nm)の使用が可能であるポルフィリン誘導体を探索し、PDTに適した光増感剤を提供することを目的として、種々の研究を重ねた。

【0009】

【問題を解決するための手段】その結果、以前出願の誘導体(特開平5-97857号)の中で血液由来のプロトポルフィリンより合成誘導体化したクロリン類の側鎖に、ある種のイミノ基およびアスパラギン酸残基を結合させると、単一成分で癌組織に対して優れた集積性と正常組織より速やかな排出性を、更に670nm以上の最長波長吸収端を持ち、かつ良好なPDT効果を有することを見出した。

【0010】また本発明者らは以前出願の誘導体(特開平5-97857号)と同様に、これらクロリン誘導体とアルブミンの混液の紫外線吸収(UV)スペクトルを分析したところ、スペクトルの動向が正の方向すなわち特定臓器、特に癌への親和性につながっていることが分かった。

【0011】一方、本発明者らは以前出願の誘導体(特開平4-276488号)と同様に薄層クロマトグラフ

イー(TLC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により光に対する反応性の強弱を簡便に評価できる。ダンシルメチオニン基質の系を用いる光増感酸化反応によりこれらクロリン誘導体を評価したところ、強い作用を持つことがわかった。

【0012】本発明は上記の知見に基づいて完成されたものであって、その要旨は

一般式 (I) 化1

(式中、R<sub>1</sub>はCH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、CH<sub>2</sub>CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>、R<sub>2</sub>はアスパラギン酸から水素を除いた残基)で示されるポルフィリン化合物(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む)を表わす。

【0013】本発明のポルフィリン化合物は、自体常套によって製造することができる。一般式(I)に対応するポルフィリン化合物にあつては、まずアルデヒド基を有する化合物に誘導体化し(工程a)、得られたクロリン誘導体にアスパラギン酸の残基を結合せしめる(工程b)、そして種々のヒドロキシルアミン誘導体を縮合させる(工程c)。また必ずしも工程(b)、(c)は順次反応させる必要はなく(c)、(b)のように工程順が代わっても良い。

【0014】構成工程(a)はJ. E. Falk著[Porphyrins and Metalloporphyrins](Elsevier発行、1975年)およびD. Dolphin著[The Porphyrins](Academic Press発行、1978年)等に記載された常套の方法によってこれを行うことができる。

【0015】例えば(I)に対応するR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>を有するポルフィリン化合物であるものは、特開昭61-7279号、特公昭63-13997号、特公平6-15545、特公平7-25763号、特開平2-138280号、特開平4-59779号、特開平5-97857号および特願平3-323597号に記載された方法に従ってこれを調製すれば良い。すなわちクロリン化工程(a)についてはプロトポルフィリンジメチルエステル(以下PP-Meと言う)を光化学反応処理して得られた1-ヒドロキシ-2-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリンジメチルエステル(以下P-Meと言う)を調製する(ただし、4つのテトラピロール環のうちAおよびB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリンジメチルエステル体も含む。)

【0016】次にアミノ酸の残基の結合工程(b)に付す。すなわち、R<sub>2</sub>が水酸基であるポルフィリン化合物(I)にアスパラギン酸を反応させて、R<sub>2</sub>がアスパラギン酸担持ポルフィリン化合物(I)を製造する。このものは泉屋ら著[ペプチド合成の基礎と実験](丸善発

行、1985年)等に記載された常套の方法によってこれを行うことができ、特開昭64-61481号、特公平7-25763号、特開平2-138280号および特開平4-59779号に記載された方法に従ってこれを調製すればよい。

【0017】この場合、要はポルフィリン化合物の側鎖にアスパラギン酸の残基を導入すればよいから、(I)のR<sub>2</sub>側鎖のカルボキシル基とアスパラギン酸のアミノ基との間で反応を進行させることが好ましく、このため前者のカルボキシル基および/または後者のアミノ基を常套の反応性基に変換したり、両者に存在する反応に関与することが好ましくない官能基を適宜に保護することが考慮されてよい。なお、いずれの場合も適宜脱水剤や脱酸剤のような反応促進剤や縮合剤の使用も考慮されてよい。

【0018】以上のようにして構成したクロリン化合物を縮合工程(c)に付す。P-Meに、ヒドロキシルアミン誘導体を反応させて縮合体ポルフィリン化合物を製造する。このものは一般有機化学実験書中〔ヒドロキシルアミンとアルデヒド化合物との縮合反応〕に記載された常套の方法によってこれを行うことができる。なお人為的に合成する代わりに、植物や動物のような天然資源からこれを採取してもよい。

【0019】以下、代表例を挙げてポルフィリン化合物(I)の調製を更に具体的に説明する。例えばP-Meを加水分解して得られた1-ヒドロキシ-2-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン(以下Pと言う)を調製する(ただし、4つのテトラピロール環のうちAおよびB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリンも含む。)。これに、アスパラギン酸メチルエステル等を溶媒中で縮合剤〔例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)や水溶性カルボジイミド(WSC)〕等を用いて反応せしめて、R<sub>2</sub>の側鎖にアスパラギン酸残基が結合したポルフィリン化合物(I)を得る。次いで、ヒドロキシルアミン誘導体(例えばO-メチルヒドロキシルアミン、O-エチルヒドロキシルアミン、O-ベンジルヒドロキシルアミン等)を溶媒中で縮合剤(例えばピリジン、ピペリジン、酸、アルカリ等)を用いて反応せしめて、R<sub>1</sub>の側鎖にこれらの化合物が縮合したポルフィリン化合物(I)を得る。その具体例としては以下のものを挙げることができる。

【0020】(1)13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-メトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ポルフィン(以下NOMe-P-diAspと言う)

(2)13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-エトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ポル

フィン(以下NOEt-P-diAspと言う)

(3)13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-イソブトキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ポルフィン(以下NOiSoBu-P-diAspと言う)

(4)13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-ベンジルオキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ポルフィン(以下NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-diAspと言う)

(5)13、17-ビスプロピオニルアスパラギン酸-3-エテニル-7-ヒドロキシ-8-ベンタフルオロベンジルオキシイミノエチリデン-2、7、12、18-テトラメチル-ポルフィン(以下NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-diAspと言う)

【0021】本発明によるポルフィリン誘導体の医薬品製剤の製造は自体公知法により行われ、本発明による誘導体を適当な緩衝液で溶解するだけでよい。好適な添加物として例えば医薬的に認容できる溶解補助剤(例えば有機溶媒)、pH調剤(例えば酸、塩基、緩衝液)、安定剤(例えばアスコルビン酸)、賦形剤(例えばグルコース)、等張化剤(例えば塩化ナトリウム)などが配合されても良い。

【0022】本発明による薬剤はPDT用薬剤としての必要十分な特性すなわち長燐光寿命、アルブミンに対する親和性、特定臓器特に癌に対する特異的集積性、ダンシルメチオン評価による光殺細胞効果、吸収波長、水溶性、純度などを充分満足しているものである。本発明による薬剤の良好な水溶性は、高濃度溶液(50mg/ml)の製造を可能とし、更に本発明による薬剤は試験管内だけでなく生体内でも高い安定性を示す。一般に、PDT用薬剤として適用するためには本発明の薬剤を1mg~5mg/kg体重の量で投与するのが望ましい。

【0023】

【作用】本発明にかかるポルフィリン化合物は、ポルフィリン骨格の側鎖にアミノ酸残基、またはアルデヒド縮合体を有する点に化学構造上の特徴を有し、その結果種々の生理学的もしくは薬理学的特性を発揮する。

【0024】これらポルフィリン誘導体は癌細胞に選択的に集積し、かつ癌細胞からの排泄が遅い。なお、正常な臓器や細胞からは速やかに排泄されるため、それらに損傷を与えることはない。元来、ポルフィリン誘導体の殆どのは光に対して強い作用を有するが、本発明に従ってポルフィリン誘導体の側鎖に多官能性化合物残基を導入することによって正常組織からの排泄性を高めるとともに、光毒性の発現を極力抑制するようデザインした誘導体が可能となった。また、ポルフィリンをクロリン誘導体化して波長がレッドシフトすることにより治療効果の深達度をはかることができた。これらの特性

(癌親和性、光殺細胞効果、吸収波長、水溶性)に基づき、本発明のポルフィリン誘導体は特定の臓器、特に癌や悪性腫瘍に対するPDT薬剤として有用である。

【0025】以下実施例を挙げて説明する。なお、実施例での収率はすべて出発原料であるP-P-Meから換算して求めた値である。

【0026】

【実施例】

実施例 1

Pの合成

R. K. Dinelloらの方法 [The Porphyrins, Academic Press発行、Vol. 1, 303 (1978)] に準じて合成した。P-P-Me 100gをクロロホルム10lに溶解し、光照射下一週間反応させた。(ポルフィリンからクロリン誘導体化) 反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: n-ヘキサン-クロロホルム) にて精製して、P-Meを得た。(50.0g) 続いて、これをピリジン・メタノール混液中で加水分解して暗緑色結晶のPを得た。(43.0g、収率42.7%)

【0027】実施例 2

ポルフィリンのアスパラギン酸誘導体化

実施例1で得たP 2gをテトラヒドロフランに溶解しジシクロヘキシルアミン(DCHA)にて常法によりP-DCHA塩(2.0g)とした。本DCHA塩をクロロホルム150mlに溶解し、アスパラギン酸ジメチルエステル(AspMe)塩酸塩2gを加え、攪拌下に水溶性カルボジミド(WSC) 2gを徐々に加えて1.5時間反応せしめた。反応後(TLCにて反応終末点を確認)、反応液を水洗分液後、クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-エーテル-n-ヘキサンにて再沈殿および再結晶化を繰り返して、暗緑色結晶のフォトプロトポルフィニル-6,7-ビスアスパラギン酸テトラメチルエステル(以下P-AspMeと言う)を得た。(1.2g、収率17.3%)

【0028】実施例 3

NOMe-P-di Asp (1) の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをピリジン20mlに溶解し室温攪拌下にO-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOMe-P-di Asp (1)を得た。(390mg、13.9%)

【0029】実施例 4

NOEt-P-di Asp (2) の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをピリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-エチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOEt-P-di Asp (2)を得た。(420mg、14.8%)

【0030】実施例 5

NOiSoBu-P-di Asp (3) の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをピリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-イソブチルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOiSoBu-P-di Asp (3)を得た。(450mg、15.3%)

【0031】実施例 6 NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-di Asp (4) の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをピリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-ベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、60分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-P-di Asp (4)を得た。(400mg、13.1%)

【0032】実施例 7

NOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-di Asp (5) の合成

実施例2で得られたP-AspMe 500mgをピリジン20mlに溶解し、室温攪拌下にO-(ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩150mgを添加、120分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロ

ホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再沈殿を行い沈殿を濾取乾燥後、ピリジン10mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム10mlを加え加水分解を行った。1N塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をメタノール-酢酸エチル-*n*-ヘキサンにて再沈殿を行い、暗緑色結晶のNOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-P-diAsp (5)を得た。

(390mg、11.7%)

#### 【0033】実施例 8

摘出器官でのレーザー照射(励起蛍光スペクトル)  
ニトロソアミン発癌の肝癌細胞を移植した14~21日目のゴールデンハムスター(1群五匹)にリン酸緩衝液(1ml)にて希釈した5mgの被験薬剤NOMe-P

-diAsp (1)を静注後、癌を含む各臓器を摘出し、得られた各器官にN<sub>2</sub>-pulsed laser (N<sub>2</sub>、337nm、2ns、400~1000nm)を照射、励起蛍光スペクトルを測定し、470nmのNADHのピーク波長を基準として600~900nmの波長を検討した。(N<sub>2</sub>-PLS測定)以下同様にして得られた結果(癌/各臓器 比)を表1に示す。表1は薬剤投与3時間後に摘出した各器官の各励起蛍光スペクトルを測定し、470nmのピーク波長を基準1として600~900nmでのピーク波長を算出した値を示す。

【0034】

【表1】

化 合 物 名	癌/臓器			
	癌/肝	癌/肺	癌/腎	癌/血漿
(1) NOMe-P-diAsp	0.16	0.91	0.25	1.07
(2) NOEt-P-diAsp	1.16	-	6.70	0.32
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-diAsp	1.84	17.0	34.0	5.40
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-diAsp	2.80	14.0	2.80	0.07

#### 【0035】実施例 9

ダンシルメチオニンを用いる光増感酸化反応の評価  
基質(ダンシルメチオニン)10μMをクロロホルム1mlに溶解し、前記実施例で得られた増感剤0.1μMを加え、攪拌下にCold Spot PICL-SX (Nippon P. I. Co., Ltd.) (ハロゲンランプ、150W、80,000Lux)で照射した。光照射1分毎に反応液をTLC板(Kieselgel 60 F254)にスポットし、クロロホルム-メタノール(3:2)で展開後、UVランプ(254nm)でダンシルメチオニンとその酸化生成物(ダンシル

メチオニン スルホキシド)を確認した。TLC板上でダンシルメチオニンが完全に消失した時間を反応終了時間とし、各増感剤の光酸化反応の強弱を比較検討した。その結果を図1および表2に示す。なお、図1中縦軸はRfを横軸は時間(分)を示し、Rf値0.79はダンシルメチオニン、0.43はダンシルメチオニン スルホキシドのスポットである。また、表2の数値は反応完了時間を分で示し、この値(分)が小さければ小さいほど光酸化反応が強いことを意味する。

【0036】

【表2】

化 合 物 名	光反応の強さ
Photofrin®	10<
(1) NOMe-P-diAsp	4
(2) NOEt-P-diAsp	4
(3) NOisoBu-P-diAsp	4
(4) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -P-diAsp	4
(5) NOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> -P-diAsp	4

## 【0037】実施例 10

## 紫外線吸収スペクトル分析（アルブミンテスト）

ポルフィリン化合物はアルブミン溶液中で、二単量体あるいは多量体を形成することが知られている。この性質はアルブミン濃度を種々変えて分析を行うことで極大吸収値の移動または吸光係数の変動がみられることで判る。したがって癌細胞との親和性を検討するには簡単なスクリーニングテストである。アルブミン54mgを3mlの生理食塩水に溶解し、1.8%濃度とする。次いでこれを10倍希釈して0.18%とした液を公比3で希釈して各アルブミン濃度（1.8、0.18、0.06、0.02、0.0066、0.0022%）の液を調製した。一方、ポルフィリン誘導体1mgをリン酸緩

衝液（pH8.0）1mlに溶解し、生理食塩水で100mlにした。そしてアルブミン希釈液2mlとポルフィリン溶液2mlを混合し、混液のアルブミン最終濃度を0.9、0.09、0.03、0.01、0.0033、0.0011%とし紫外線吸収スペクトル測定（350～900nm）を行った。またアルブミン希釈液のかわりに生理食塩水およびメタノール溶液中でも同様に測定した。これらの測定結果を表3に示す。その代表例として、NOMe-P-diAsp（1）の紫外線吸収スペクトルを図2および図3に示す。

## 【0038】

## 【表3】

化 合 物 名	波 長 (nm)		
	生 理 食 塩 水	メ タ ノー ル	0.9 % ア ル ブ ミ ン
(1) NOMe-P-diAsp	665	667	670
(2) NOEt-P-diAsp	665	667	670
(3) NOisoBu-P-diAsp	665	667	670
(4) NOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -P-diAsp	666	667	670
(5) NOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F-P-diAsp	666	666	670

30

## 【0039】実施例 11

## 赤外吸収スペクトル分析

赤外分光光度計によりKBr錠剤法にて本誘導体の赤外吸収スペクトルを測定した。その代表例として、NOEt-P-diAsp（2）の赤外吸収スペクトルを図4に示す。

## 【0040】

【発明の効果】本発明のポルフィリン誘導体は癌細胞への集積性、外部エネルギーに対する反応性ならびに癌細胞の破壊作用を有し、しかも正常細胞に対して毒性を発現することがないから、癌治療薬あるいは癌診断薬として極めて有用である。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】NOisoBu-P-diAsp（3）テトラメチルエステルを増感剤として用いた薄層クロマトグラムを示す図である。

【図2】NOMe-P-diAsp（1）の紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図3】NOMe-P-diAsp（1）の紫外吸収ス

ペクトルを示す図である。

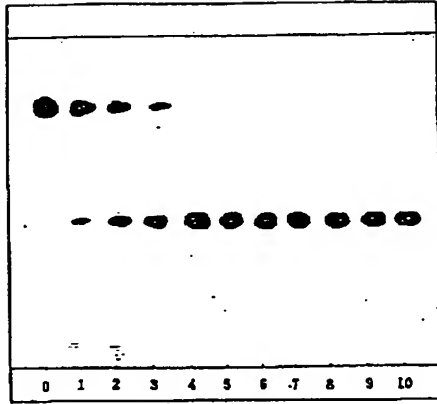
【図4】NOEt-P-diAsp（2）の赤外吸収スペクトルを示す図である。

## 【符号の説明】

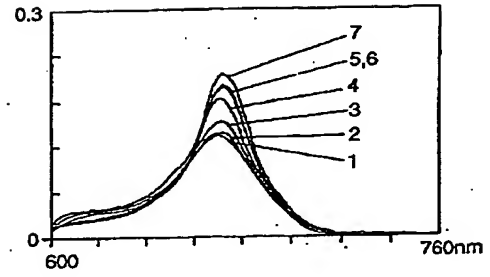
- 1 ポルフィリン溶液と生理食塩水の混液（アルブミン濃度0%）
- 2 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.0011%）
- 3 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.0033%）
- 4 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.01%）
- 5 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.03%）
- 6 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.09%）
- 7 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液（アルブミン濃度0.9%）
- 8 ポルフィリン溶液とメタノールの混液

40

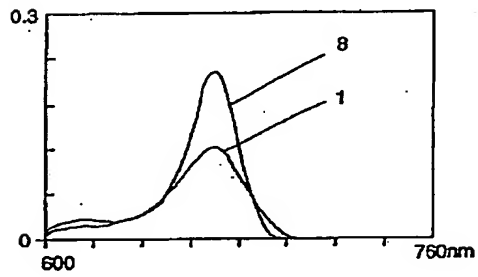
【図1】



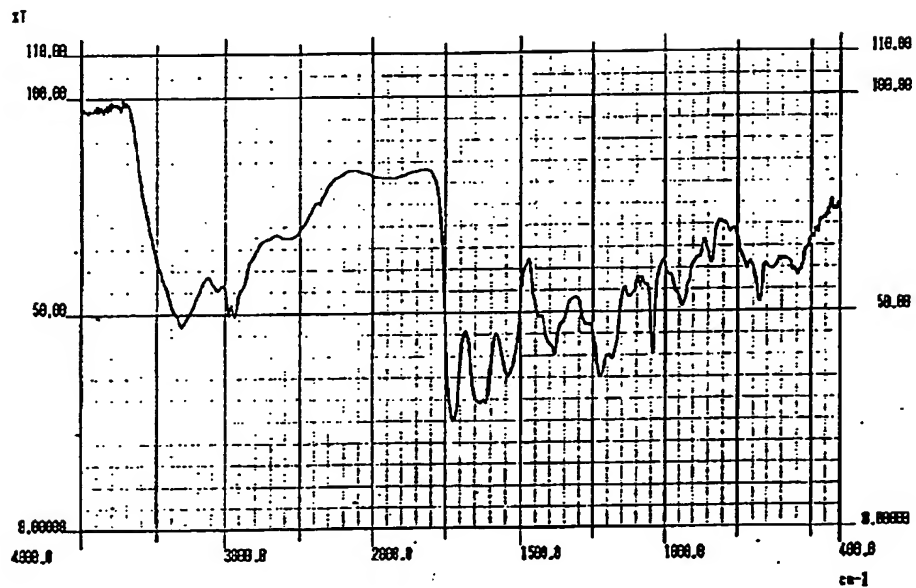
【図2】



【図3】



【図4】





フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

// A 61 N 5/06

識別記号

庁内整理番号

F I

A 61 N 5/06

技術表示箇所

E